

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of :
Hiroshi YANAGAWA et al. : Docket No. 2001-0580A
Serial No. 09/853,939 : Group Art Unit 1653
Filed May 11, 2001 : Examiner Not Yet Assigned
SENSOR PROTEIN AND USE THEREOF : Confirmation No. 7033

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC 119

Assistant Commissioner for Patents,
Washington, DC 20231

THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED
TO CHARGE ANY DEFICIENCY IN THE
FEES FOR THIS PAPER TO DEPOSIT
ACCOUNT NO. 23-0975

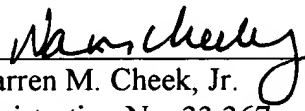
Sir:

Applicants in the above-entitled application hereby claim the date of priority under the International Convention of Japanese Patent Application No. 10/320102, filed November 11, 1998, as acknowledged in the Declaration of this application.

A certified copy of said Japanese Patent Application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

Hiroshi YANAGAWA et al.

By 
Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicants

WMC/gtn
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
December 20, 2001

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

1998年11月11日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第320102号

出願人

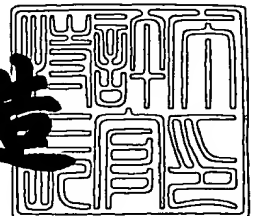
Applicant(s):

三菱化学株式会社

2001年 5月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3041899

【書類名】 特許願

【整理番号】 98MCC058

【提出日】 平成10年11月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 19/00
C12N 9/00
C12N 15/09
C12N 15/52
G01N 33/00

【発明の名称】 サンドイッチ型融合高分子およびそれを用いたセンサー

【請求項の数】 22

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 柳川 弘志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 土居 信英

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市南大谷 1 1 号 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 根本 直人

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100110607

【弁理士】

【氏名又は名称】 間山 進也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 062651

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サンドイッチ型融合高分子およびそれを用いたセンサー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 信号変換部位を含む第 1 の高分子部と第 1 の高分子部の間に挿入された分子認識部位を含む第 2 の高分子部とからなるサンドイッチ型融合高分子。

【請求項 2】 信号変換部位を含む第 1 の高分子部が天然または人工タンパク質である請求項 1 に記載の高分子。

【請求項 3】 人工タンパク質が天然タンパク質の変異体である請求項 2 に記載の高分子。

【請求項 4】 人工タンパク質が合成タンパク質である請求項 2 に記載の高分子。

【請求項 5】 信号変換部位を含む第 1 の高分子部が触媒活性を有する酵素タンパク質、蛍光性タンパク質または蛍光物質標識タンパク質である請求項 1 に記載の高分子。

【請求項 6】 酵素タンパク質がアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グルコースオキシダーゼまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼである請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 7】 蛍光性タンパク質が緑色蛍光タンパク質である請求項 5 に記載の高分子。

【請求項 8】 信号変換部位を含む第 1 の高分子部が、デオキシリボ核酸、リボ核酸およびペプチド核酸から選ばれる天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体である請求項 1 に記載の高分子。

【請求項 9】 天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体が蛍光標識されている請求項 8 に記載の高分子。

【請求項 10】 信号変換部位を含む第 1 の高分子部が天然の多糖またはその変異体である請求項 1 に記載の高分子。

【請求項 11】 多糖またはその変異体が蛍光標識されている請求項 10 に記載の高分子。

【請求項 12】分子認識部位を含む第2の高分子部が天然のタンパク質またはその変異体である請求項1に記載の高分子。

【請求項 13】分子認識部位を含む第2の高分子部が、触媒活性を有する酵素タンパク質および低分子物質または高分子物質に結合性のタンパク質から選択される請求項1に記載の高分子。

【請求項 14】分子認識部位を含む第2の高分子部が、抗体、補酵素結合能を持つタンパク質およびATP結合タンパク質から選択される請求項13に記載の高分子。

【請求項 15】分子認識部位を含む第2の高分子部が、デオキシリボ核酸、リボ核酸およびペプチド核酸から選択される天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体である請求項1に記載の高分子。

【請求項 16】リボ核酸が、tRNA、rRNA、mRNAおよびリボザイムから選択される請求項15に記載の高分子。

【請求項 17】分子認識部位を含む第2の高分子部が天然の多糖またはその変異体である請求項1に記載の高分子。

【請求項 18】請求項1に記載のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNA。

【請求項 19】請求項1に記載のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された宿主を培養し、該宿主中で該DNAを発現させて該サンドイッチ型融合高分子を製造する方法。

【請求項 20】請求項1に記載のサンドイッチ型融合高分子のセンサーとしての使用。

【請求項 21】請求項1に記載のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNAをランダムに変異させ、得られるランダム変異DNAを含む形質転換宿主中での該ランダム変異DNAの発現によって得られる変異サンドイッチ型融合高分子の中から、第2の高分子部に含まれる分子認識部位とこれに結合する標的分子との相互作用の結果変化する、第1の高分子部に含まれる信号変換部位から発せられる検出信号の変化の大きさに基づいて所望のサンドイッチ型融合高分子をスクリーニングする方法。

【請求項 22】 検出信号が蛍光である請求項 21 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、信号変換部位を含む第 1 の高分子部と第 1 の高分子部の間に挿入された分子認識部位を含む第 2 の高分子部とからなるサンドイッチ型融合高分子、該サンドイッチ型融合高分子をコードする DNA、該サンドイッチ型融合高分子を製造する方法、該サンドイッチ型融合高分子のセンサーとしての使用および所望のセンサーとしての該サンドイッチ型融合高分子のスクリーニング法に関する。

バイオセンサーは、生物学的な分子認識機構と物理学的な信号変換技術とを結びつけた分子センサーである。タンパク質などの生体高分子の分子認識能を利用した分子センサーを構築するためには、分子認識部位と信号変換部位という 2 つのアロステリックな部位（異なる部位）を結びつける必要がある。本発明は、この連結のための一般的な方法およびこれによって得られる分子センサーに関するものであり、本発明によって、アロステリックな調節機能をもつバイオセンサーを自由にデザインすることが可能となる。

【0002】

【従来の技術】

タンパク質工学によりセンサータンパク質をデザインした例がいくつか報告されている (Hellenga & Marvin 1998. Trends Biotechnol. 16, 183-189)。例えば、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素に cAMP が結合すると 2 つのサブユニットが解離する性質を利用した cAMP センサー (Adams et al. 1991. Nature 349, 694-697)、マルトース結合タンパク質の構造がマルトースの結合によって変化する性質を利用したマルトースセンサー (Marvin et al. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4366-4371)、カルモジュリンの構造変化を利用したカルシウムイオン センサー (Miyawaki et al. 1997. Nature 388, 882-887; Romoser et al. 1997. J. Biol. Chem. 272, 13270-13274) などが報告されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

従来の高分子センサーでは、標的分子の結合にともなって、サブユニットが解離・会合したり、構造が大きく変化するような天然に存在するアロステリックタンパク質が利用されてきた。そのような高分子の種類は限られているので、当然それらが認識できる分子の種類も制限されていた。例えば、カルモジュリンやマルトース結合タンパク質を利用する限り、カルシウムイオンやマルトースに対するセンサーしかデザインできない。しかし、生体高分子の中には、標的分子の結合によって構造がほとんど変化しないものが数多く存在する。そのようなさまざまな高分子を利用するためには、それらの分子認識部位をどのようにして信号変換部位と結びつけて、アロステリックな調節作用を実現するかが課題となっていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

最近、本発明者らは、あるタンパク質の途中に別のタンパク質を挿入したサンドイッチ型の融合タンパク質が簡単に構築できることを報告した (Doi et al. 1997. FEBS Lett. 402, 177-180)。従来の融合タンパク質では、末端同士で結合された2つのタンパク質の活性は融合による影響をほとんど受けないのに対して、サンドイッチ型融合タンパク質では、挿入するタンパク質の構造安定性の違いに応じて、挿入される側のタンパク質の活性に大きな影響が出ることが予想される。そこで鋭意検討を行った結果、分子認識部位を含む高分子を、信号変換部位を含む高分子に挿入すると、標的分子の分子認識部位への結合にともなう構造の安定化によって検出信号が変化する分子センサーが自由にデザインできることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) 信号変換部位を含む第1の高分子部と第1の高分子部の間に挿入された分子認識部位を含む第2の高分子部とからなるサンドイッチ型融合高分子、

(2) 信号変換部位を含む第1の高分子部が天然または人工タンパク質である1項に記載の高分子。

(3) 人工タンパク質が天然タンパク質の変異体である2項に記載の高分子、

- (4) 人工タンパク質が合成タンパク質である 2 項に記載の高分子、
- (5) 信号変換部位を含む第 1 の高分子部が触媒活性を有する酵素タンパク質、蛍光性タンパク質または蛍光物質標識タンパク質である 1 項に記載の高分子、
- (6) 酵素タンパク質がアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グルコースオキシダーゼまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) である 5 項に記載のタンパク質、
- (7) 蛍光性タンパク質が緑色蛍光タンパク質である 5 項に記載の高分子、
- (8) 信号変換部位を含む第 1 の高分子部が、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA) およびペプチド核酸 (PNA) から選ばれる天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体である 1 項に記載の高分子、
- (9) 天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体が蛍光標識されている 8 項に記載の高分子、
- (10) 信号変換部位を含む第 1 の高分子部が天然の多糖またはその変異体である 1 項に記載の高分子、
- (11) 多糖またはその変異体が蛍光標識されている 10 項に記載の高分子、
- (12) 分子認識部位を含む第 2 の高分子部が天然のタンパク質またはその変異体である 1 項に記載の高分子、
- (13) 分子認識部位を含む第 2 の高分子部が、触媒活性を有する酵素タンパク質および低分子物質または高分子物質に結合性のタンパク質から選択される 1 項に記載の高分子、
- (14) 分子認識部位を含む第 2 の高分子部が、抗体、補酵素結合能を持つタンパク質および ATP 結合タンパク質から選択される 13 項に記載の高分子、
- (15) 分子認識部位を含む第 2 の高分子部が、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA) およびペプチド核酸から選択される天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体である 1 項に記載の高分子、
- (16) リボ核酸 (RNA) が、tRNA、rRNA、mRNA およびリボザイムから選択される 15 項に記載の高分子、
- (17) 分子認識部位を含む第 2 の高分子部が天然の多糖またはその変異体である 1 項に記載の高分子、

(18) 1項に記載のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNA、

(19) 1項に記載のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された宿主を培養し、該宿主中で該DNAを発現させて該サンドイッチ型融合高分子を製造する方法、

(20) 1項に記載のサンドイッチ型融合高分子のセンサーとしての使用、

(21) 1項に記載のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNAをランダムに変異させ、得られるランダム変異DNAを含む形質転換宿主中での該ランダム変異DNAの発現によって得られる変異サンドイッチ型融合高分子の中から、第2の高分子部に含まれる分子認識部位とこれに結合する標的分子との相互作用の結果変化する、第1の高分子部に含まれる信号変換部位から発せられる検出信号の変化の大きさに基づいて所望のサンドイッチ型融合高分子をスクリーニングする方法、および

(22) 検出信号が蛍光である21項に記載の方法、
に存する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明のサンドイッチ型融合高分子は、信号変換部位を含む第1の高分子部の間に標的分子を認識する分子認識部位を含む第2の高分子部を挿入したものである。信号変換部位を含む第1の高分子部は、代表的には天然または人工タンパク質である。人工タンパク質としては、天然タンパク質の変異体や有機合成により得られる合成高分子が挙げられる。

具体的には、信号変換部位を含む第1の高分子部は、触媒活性を有する酵素タンパク質、蛍光性タンパク質、蛍光物質標識タンパク質等であり、さらに具体的には、酵素タンパク質としては、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グルコースオキシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)等が挙げられる。その他、蛍光発色団を含む緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein, GFP)のように、物理学的手法で検出可能な信号を発することのできる高分子も上記第1の高分子に含まれる。さらに、信号変換部位を含む第1の高分子部としては、DNA(デオキシリボ核酸)

、RNA（リボ核酸）、PNA（ペプチド核酸）等の天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体、これらが蛍光標識されたもの、天然の多糖またはその変異体、あるいはこれらが蛍光標識されたものも挙げられる。要するに、高分子信号変換部位を含む第1の高分子部は、第2の高分子部の分子認識部位とその標的分子との間の相互作用によって生じる、第2の高分子部の構造安定性の違いによって信号変換部位の活性を大きく変化させるものであればよい。

【0007】

分子認識部位を含む第2の高分子部は、天然のタンパク質またはその変異体であり、たとえば、触媒活性を有する酵素タンパク質および低分子物質または高分子物質に結合性のタンパク質等が挙げられる。具体的には、このような第2の高分子部としては、抗体、補酵素結合能を持つタンパク質およびATP結合タンパク質等が挙げられる。さらに、DNA、RNA（tRNA、rRNA、mRNA、リボザイム等）およびPNAから選択される天然の核酸もしくはその変異体または核酸誘導体、あるいは、天然の多糖またはその変異体もこのような第2の高分子部に含まれる。要するに、分子認識部位を含む第2の高分子部は、標的分子を選択的に認識して結合あるいは相互作用することのできる高分子であり、代表的には、基質を特異的に認識する酵素である。

【0008】

信号変換部位を含む第1の高分子部の配列の途中に分子認識部位を含む第2の高分子部の配列が挿入された配列を有する、本発明のサンドイッチ型融合高分子は、遺伝子工学、化学合成、酵素的合成など、一般的な高分子合成のためのあらゆる手法を用いて合成可能である。本発明のサンドイッチ型融合高分子が、ペプチド配列を有する高分子である場合には、組換えDNA技術を用いてこれを合成するのが有利である。たとえば、本発明のサンドイッチ型融合高分子のアミノ酸配列に基づいて、これをコードするDNAを常法により合成し、これをプロモーター、ターミネーター等を有する発現ベクター中発現可能な位置に挿入し、得られる発現ベクターで適当な宿主を形質転換して培養することにより本発明のサンドイッチ型融合高分子を製造できる。上記した合成DNAに代えて、第1の高分子部をコードする天然由来のDNAを適当な制限酵素を用いて切断し、次いで、切断して

得られる2つのDNA断片と連結可能な両末端を有する、天然由来の第2の高分子部をコードするDNAを、切断した第1の高分子部をコードする2つのDNA断片の切断部に連結して、第1の高分子部をコードする天然由来のDNAの間に天然由来の第2の高分子部をコードするDNAを挿入することも可能である。また、第1の高分子部のN末端およびC末端をコードする2つの所望のDNA断片は、適当な複数のプライマーを用いて第1の高分子部をコードする天然の遺伝子から合成することもできる。さらに、適当な配列のプライマーを用いるPCRにより適当な制限酵素認識部位を第1の高分子部をコードする天然由来のDNAに挿入し、これを上記のようにして切断し、本発明のサンドイッチ型融合高分子の第1の高分子部をコードするDNAの2つの断片を合成できる。上記のようにして得られる第1の高分子部をコードする2つのDNA断片と第2の高分子部をコードするDNA断片とは、常法によりリガーゼで連結され、所望の配列を有する本発明のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNA断片が得られる。

【0009】

このようにして得られるサンドイッチ型融合高分子をコードするDNA配列は、適当な発現制御配列（プロモーター）に作動可能なように連結される。このようなプロモーターとしては、ファージλ PLプロモーター、T7プロモーター、大腸菌の *lac*, *trp*, *lpp* および *tac* プロモーター、バチルス属菌の SP01 プロモーター、*penP* プロモーター、酵母の *pho5* プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、SUC2プロモーター、GAL4プロモーター、*Mfα* プロモーター、昆虫細胞の多角体プロモーター、P10プロモーター、動物細胞用のSV40初期および後期プロモーター、レトロウイルスのLTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、メタロチオネインプロモーター、植物細胞用の35Sプロモーター、イネアクチン遺伝子のプロモーター等が挙げられる。本発明のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNA配列を含有する発現ベクターは、転写されるDNA領域、転写開始および転写終結のシグナル配列を含む。一般に、発現ベクターは、リプレッサー結合部位およびエンハンサーなどにより作動する発現制御領域を含む。その他、発現ベクターは、選択マーカーを含有する。好適なマーカーは、真核細胞用のジヒドロ葉酸レダク

ターゼ (d h f r) 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、細菌用のテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子等である。d h f r 遺伝子は、メソトレキセート耐性を形質転換細胞に付与し、また、ネオマイシン耐性遺伝子は、G 4 1 8 耐性を形質転換細胞に付与する。d h f r 遺伝子欠損CHO細胞を宿主とし、d h f r 遺伝子を選択マーカーとする場合には、チミジンを含まない培地中で形質転換体を選択できる。この場合、メソトレキセート (MTX) 濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子と同時に本発明のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNA配列が細胞内で増幅され、高発現のCHO (d h f r⁻) 細胞が得られる。

【0010】

上記発現ベクターは、必要に応じて、シグナル配列をタンパク質のN末端側に付加するように構築される。そのようなシグナル配列は、大腸菌宿主の場合には、Pho A、SUC 2シグナル配列等であり、酵母宿主の場合には、M f α 、SUC 2シグナル配列等であり、動物細胞宿主の場合には、 α -インターフェロンシグナル配列等である。

【0011】

本発明のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNA配列の発現が行われる宿主細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、アスペルギウス属菌などの真核細胞、細菌細胞などの原核細胞である。リン酸カルシウムトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染その他の方法により上記発現ベクターは宿主細胞に導入される。

上記したプロモーターの制御下、上記した哺乳動物細胞、酵母、細菌等の宿主において、本発明のサンドイッチ型融合高分子を発現できる。原核宿主の例は、大腸菌、枯草菌、サルモネラ菌、シュードモナス、ストレプトミセス、スタフィロコッカス等である。酵母としては、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ、ピキア・パストリス等が挙げられる。哺乳動物細胞の例は、COS-7細胞、マウスAtT-20細胞、ラットGH3細胞、ラットMtT細胞、マウスMIN6細胞、Ver o細胞、C127細胞、CHO細胞、d h f r 遺伝子欠損CHO細胞、HeLa細胞、L細胞、BHK細胞、BALB 3T3

細胞、293細胞、ボウズ黒色細胞等である。

【0012】

形質転換された原核宿主は増殖され、誘導可能なプロモーターを含むベクターの場合には、温度あるいは化学誘導物質により誘導し、該細胞を炭素源（グルコース、デキストラン、可溶性澱粉等）、窒素源（アンモニウム塩、硝酸塩、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕等）および無機物（塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等）を含有する液体培地中、適当なpH（pH約5～8）で適当な時間（約3～24時間）培養する。適当な培養温度は、大腸菌については、約14～43℃、バチルス属菌の場合には、約30～40℃である。培養後、細胞を物理的あるいは化学的方法で破壊し、得られる粗抽出物から、本発明のサンドイッチ型融合高分子が精製される。上記のようにして得られるサンドイッチ型融合高分子は、常法により精製できるが、N末端に複数のヒスチジンが付加したサンドイッチ型融合高分子を産生させ、アフィニティクロマトグラフィーで精製するのが有利である。

その他、酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞を宿主とする場合には、公知の方法で細胞が培養され、また産生した本発明のサンドイッチ型融合高分子は、公知の方法で精製される。

【0013】

上記した方法で得られる、サンドイッチ型融合高分子が直ちにセンサーとして機能する場合には、以下の操作は不要であるが、センサーとしての機能をさらに高めたい場合には、高分子の配列に変異を導入して改良する操作が必要になる。その場合、（1）部位特異的に変異を導入してデザインする、（2）ランダムな変異を導入したライブラリーを作製し、その中から目的の分子が結合したときにのみ大きく信号が変化するセンサー高分子をスクリーニングする。具体的には、本発明のサンドイッチ型融合高分子をコードするDNAを含有するプラスミドを鋳型とし、第1の高分子部の中央部およびC末端部をコードするDNAの断片をマンガンイオンを加えることにより、誤りを生じやすいPCR（Error-prone PCR）を行い、第2の高分子部の前後の領域にランダムな点変異を導入し、得られるランダム変異DNAの発現によって得られる変異サンドイッチ型融合高分子から、第2の高

分子部に含まれる分子認識部位とこれに結合する標的分子との相互作用の結果変化する、第1の高分子部に含まれる信号変換部位から発せられる蛍光等の検出信号の変化の大きさに基づいて所望のサンドイッチ型融合高分子をスクリーニングすることができる。なお、上記した、本発明のサンドイッチ型融合高分子を製造するための組換えDNA実験技術は、多くの組換え実験マニュアルに記載されており、容易に実施可能であり、上記した以外の変法も可能である。

【0014】

本発明の光センサータンパク質の具体例としては、信号変換部位を含む第1の高分子である緑色蛍光タンパク質の途中に任意の分子認識部位を含む第2の高分子を挿入して得られる、標的分子の結合にともなう構造の安定化によって蛍光が増加する光センサータンパク質が挙げられる（図1参照）。図1に示されるように、分子認識部位を含む任意の高分子を、信号変換部位を含む別の高分子の途中に挿入し、これが標的分子との結合によって構造が安定化すると、検出信号が変化する。

【0015】

本発明のサンドイッチ型融合高分子は、これまで利用することができなかったさまざまな高分子の特異的分子認識機構を組み込んだ分子センサーである。また、本発明は、そのような分子センサーを自由にデザインしたり、スクリーニングを可能にする。本発明の分子認識センサーを使用すれば、複雑な溶媒中に含まれる特定の分子（細胞、タンパク質、ウイルス、抗体、DNA、電解質、薬品、殺虫剤、環境ホルモン、その他の低分子量化合物など）の検出が可能となる。このセンサーの応用範囲は広く、細胞生物学、生物医学、環境、バイオコンピュータなど多くの分野で利用できる。

【0016】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら制限されるものでない。

【0017】

実施例 1

 β -ラクタマーゼ・インヒビターを認識する GFP センサーの創製

分子認識部位を含む高分子として β -ラクタマーゼを選択した。 β -ラクタマーゼは、その単独のX線結晶構造の他に、 β -ラクタマーゼ・インヒビタータンパク質(β -Lactamase Inhibitor Protein, BLIP)との複合体のX線結晶構造も決定されており、 β -ラクタマーゼの構造は、BLIPの結合によってほとんど変化しないことが分かっている (Strynadka et al. 1996. Nature Struct. Biol. 3, 290-297)。一方、信号変換部位を含む第1の高分子としては緑色蛍光タンパク質(GFP)を選んだ。GFPは蛍光発色団を内蔵しており、紫外線照射により緑色の蛍光を発する。まず、 β -ラクタマーゼをGFPの172 Glnと173 Aspとの間のループ部分に挿入した融合タンパク質を構築した。さらに、このタンパク質にランダムな変異を導入したライブラリーの中から、BLIPの結合によって、GFPの蛍光強度が増大するセンサータンパク質をスクリーニングした。得られたタンパク質が細胞内および試験管内で、BLIPに対するセンサーとして働くことを確認した。

【0018】

材料：大腸菌 JM109 およびプラスミド pUC18、pUC4KIXX (Barany 1985. Gene 37, 111-123) および pGFPuv (Cramer et al. 1996. Nature Biotechnol. 14, 315-319) は、三菱化学生命科学研究所、板谷博士より供与された。プラスミド pEOR (Priyambada et al. 1996. FEBS Lett. 382, 21-25) は大阪大学、四方博士より、BLIP 遺伝子 (Doran et al. 1990. J. Bacteriol. 172, 4909-4918) は Alberta 大学 (カナダ) の Schroeder 博士より供与された。各種酵素や試薬などは市販のものを用いた：制限酵素 Afl III、Bsp HI、Kpn I、Nco I、Nde I、Nhe I、Xba I (NEB)、Eco 47III、Eco RI (東洋紡)、Hin dIII、Sac I (ペーリンガー・マンハイム)、Xho I (宝酒造)；遺伝子キット Ligation High、Blunting High (東洋紡)；耐熱性酵素 Taq DNA Polymerase (グライナー)、Vent DNA Polymerase (NEB)；カルベニシリン (シグマ)、カナマイシン、L-アラビノース、D-グルコース、尿素 (和光純薬)、IPTG (ナカライテスク)；Ni-NTA 樹脂 (QIAGEN)。遺伝子工学の基本操作 (クローニング、大腸菌の形質転換および培

養、プラスミドの回収など)は、実験マニュアルである、サンプブルック等のモレキュラー・クローニングMolecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989))に従った。

【0019】

プラスミドの構築

プラスミド pND101 (図2)を以下の手順で構築した。まず、BAD プロモーターおよびその発現を調節する AraC タンパク質遺伝子 (Guzman et al. 1995. J. Bacteriol. 177, 4121-4130)を、大腸菌 JM109 ゲノムを鋳型として、プライマー (配列番号1および2)を用いて PCR で増幅し、Nco I および Nde I で消化し、pEOR の Afl III-Nde I 部位にクローニングした。次に、得られたプラスミドを Bsp HI で消化してアンピシリン耐性遺伝子を切除し、代わりに pUC4KIX X の Afl III-Xho I 断片に含まれるカナマイシン耐性遺伝子と置換した。さらに、BLIP 遺伝子をプライマー (配列番号3および4)で増幅した PCR 断片を Nde I および Sac I で消化し、BAD プロモーターの下流に挿入した。これにより、BLIP の発現を、L-アラビノース存在下で誘導し、D-グルコースの存在下で抑制することができる。得られたプラスミドの Hin dIII 部位を削除するために、Sac I および Hin dIII で消化し、平滑化处理した後、自己環化し、プラスミド pBAD-BLIP-Kn を得た。一方、GFP 遺伝子の途中に β -ラクタマーゼ遺伝子を挿入するための制限酵素部位を導入するため、pGFPuv を鋳型として、二組のプライマー (配列番号5および6) および (配列番号7および8)で、GFP のN末およびC末の DNA 断片を PCR 増幅し、それぞれを Nhe I-Kpn I ないし Kpn I-Sac I で消化し、pEOR の Nhe I-Sac I 部位に同時に挿入した。この結果、GFP の 172 Gln と 173 Asp との間に Hin dIII-Kpn I-Eco RI 部位が導入されると同時に、N末に6個のヒスチジンをコードする配列が付加された。この変異体 GFP 遺伝子を、プライマー (配列番号9および8)で PCR 増幅し、pBAD-BLIP-Kn の Ec 47III 部位に挿入した。このとき、変異体 GFP の発現量を BAD プロモーター下流の BLIP と同程度にするために、プライマー (配列番号9)に含まれる tac プロモーターの -35 領域に相当する6塩基はランダムイズしてあり、

その中から BAD プロモーターと同程度の強さのプロモーターを含むものを選択し、最終的に pND101 を得た。

【0020】

β-ラクタマーゼ遺伝子の挿入とスクリーニング

pUC18 上の β-ラクタマーゼ遺伝子をプライマー（配列番号 10 および 11）で増幅し、Hin dIII-Eco RI 消化して、pND101 上の GFP 遺伝子の Hin dIII-Eco RI 部位に挿入した（図 3）。このプライマーは β-ラクタマーゼと GFP との間のリンカーとして 9 塩基のランダム配列を含む。この DNA ライブラリーを大腸菌 JM109 に導入し、10 μg/ml 濃度のカナマイシンを含む LB プレート上でコロニーを生育させた。100 個のコロニーを任意に選んで、0.2 % L-アラビノースまたは 0.2 % D-グルコースをそれぞれ含む 2 枚のプレートに植菌し、再びコロニーを形成させ、UV 照射下で 2 つのプレートのコロニーの発する蛍光の強さに差が見えるものを選択した。選択したコロニーを液体培養し、プラスミドを回収し、それを鋳型として、プライマー（配列番号 12 および 8）を用いて Error-prone PCR (Buchholz et al. 1998. Nature Biotechnol. 16, 657-662) を行ない、β-ラクタマーゼを含む前後の領域にランダムな点変異を導入した。PCR 断片を Xho I および Xba I で消化し、元のプラスミドの同じ部位に挿入したライブラリーの中から、蛍光強度の差がさらに大きくなるクローンを選択した。このランダム変異導入と選択のサイクルを 2 回繰り返した。最終的に得られたセンサータンパク質を含む大腸菌は、BLIP が共発現していない場合（グルコースを含むプレート上では）、弱い蛍光を示すが、BLIP が共発現している場合（アラビノースを含むプレート上では）、強い蛍光を示した。すなわち、細胞内で BLIP と結合することによって、蛍光強度が増大するセンサータンパク質が得られた。

【0021】

センサータンパク質および BLIP の精製

選択されたタンパク質が実際に単独でセンサーとして働くことを試験管内で確認するために、センサータンパク質および BLIP の精製を行なった。センサータンパク質をコードするプラスミドを含む大腸菌 JM109 を、20 μg/ml カナマイ

シンを含む 2xYT 培地中 37 °C で $OD_{600} = 0.6$ になるまで培養した後、最終濃度 1 mM になるように IPTG を加え、さらに 5 時間培養した。大量発現したセンサータンパク質は主に不溶性画分に蓄積した。集菌した大腸菌を超音波破碎し、遠心分離により回収した不溶性画分を 8M 尿素で融解し、N 末にヒスチジン・タグをもつセンサータンパク質を Ni-NTA カラムに吸着・洗浄後、pH の低下により溶出した。目的のタンパク質を含む画分から透析によって尿素を除去し、センサータンパク質を再生した。一方、BLIP 遺伝子についても、N 末に 6 個のヒスチジンを付加するためのプライマー（配列番号 13 および 4）で PCR 増幅し Nde I および Sac I で消化し、pEOR の同じ部位に挿入した。このプラスミドを含む大腸菌 JM109 を、100 $\mu\text{g/ml}$ カルベニシリンを含む 2xYT 培地中で培養し、同様の方法で BLIP を大量発現・精製した。

【0022】

センサータンパク質の蛍光測定

BLIP 存在下および非存在下でのセンサータンパク質の蛍光スペクトルを、島津 RF502 蛍光分光計により測定した。GFP の途中に β -ラクタマーゼが挿入されたセンサータンパク質の放射波長 505 nm における励起スペクトルは、野生型 GFP と同様に 395 nm 付近と 475 nm 付近に 2 つの極大を示す（図 4）。このセンサータンパク質に BLIP を加えると、蛍光スペクトルの強度が 2 倍近く増大すること、および、コントロールとして BSA を加えた場合には強度変化が見られないことから、このタンパク質が BLIP を特異的に認識するセンサーとして働いていることが示された。

【0023】

【発明の効果】

本発明のサンドイッチ型融合高分子を、たとえば、特定の分子を認識できる GFP センサーとして用いれば、生きた細胞内のさまざまな分子の蛍光イメージングが可能となる。分子認識 GFP センサーは、その遺伝子を細胞内で発現させるだけで、標的分子と結合し蛍光を発するので、遺伝子導入が可能なあらゆる細胞で利用できる。また、分子認識 GFP センサーはバイオコンピュータ素子としても利用できる。現在バイオコンピュータ素子として期待されているバクテリオロド

ブシンが、光を認識してそれを分子の情報に変換する素子であるのに対して、分子認識GFP センサーは、特定の分子を認識してそれを光に変換する素子として、相補的な役割を果たすことが期待できる。

【0024】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> Sandwich type fusion high molecule and a sensor using
the same

<130> 001

<140>

<141>1988-11-

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

gcgccatggt tgcataatgt gcctgtcaaa tggac

35

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

cgcccatatgt tcactccatc caaaaaaacg ggtatg

36

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

gcccatatgg cgggggtgat gaccg

25

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

gccgagctct tatacaaggt cccactgccg

30

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

gccgctagcc atcatcatca tcatcatggt atgagtaaag gagaagaact ttcc

54

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

gccggtaccc caagcttttc aatgttgtgg cgaattttg

39

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

gccggtacca gaattcgatg gaagcgttca actag

35

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

gccgagctct ctagattatt tgtatagttc atccatgcc

39

<210> 9

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

gcatcccggg cnnnnnnttt aatcatcggc tcgtataatg tgtg 44

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

gccaaacctn nbnnbnnbca cccagaaacg ctggtg 36

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

gccgaattcv nnvnnvnnc aatgcttaat cagtgaggc 39

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

aaactcgagt acaactataa ctc

23

<210> 13

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

gcccataatgc atcatcatca tcatcatgcg ggggtgatga ccg

43

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1-13 : 合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】

分子認識センサーの概念図。分子認識部位を含む任意の高分子を、信号変換部位を含む別の高分子の途中に挿入する。標的分子の結合によって構造が安定化すると、検出信号が変化する。

【図 2】

スクリーニングおよび大量発現のためのベクター pND101の遺伝子構成を表す

図である。同ベクター中のBLIP 遺伝子の発現は、BAD プロモーターの調節因子 AraC により、L-アラビノース存在下で誘導され、D-グルコース存在下で抑制される。GFP 遺伝子の途中には β -ラクタマーゼ遺伝子を挿入するための制限酵素部位が含まれている。

【図3】

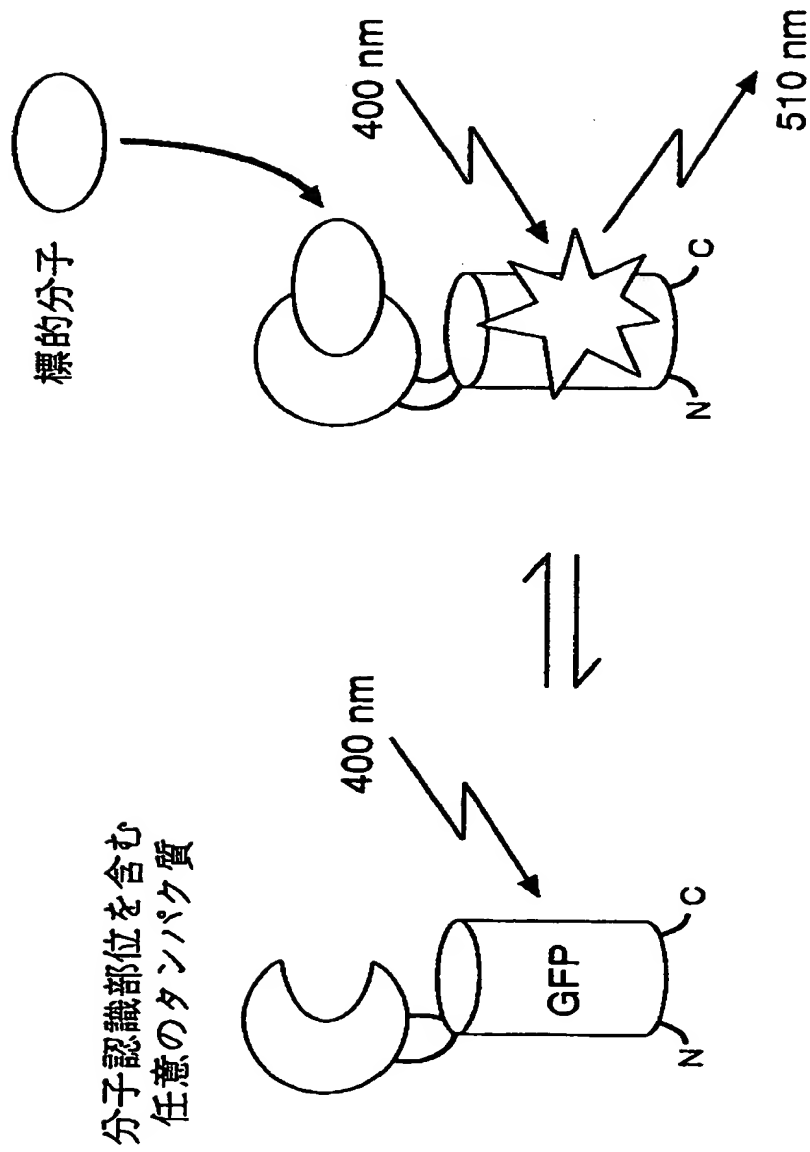
GFP 遺伝子への β -ラクタマーゼ遺伝子の挿入を示す、遺伝子DNAの配列の構築を表す図である。 β -ラクタマーゼの両端のリンカーには6塩基の制限酵素部位を含む配列と9塩基のランダム配列が含まれている。

【図4】

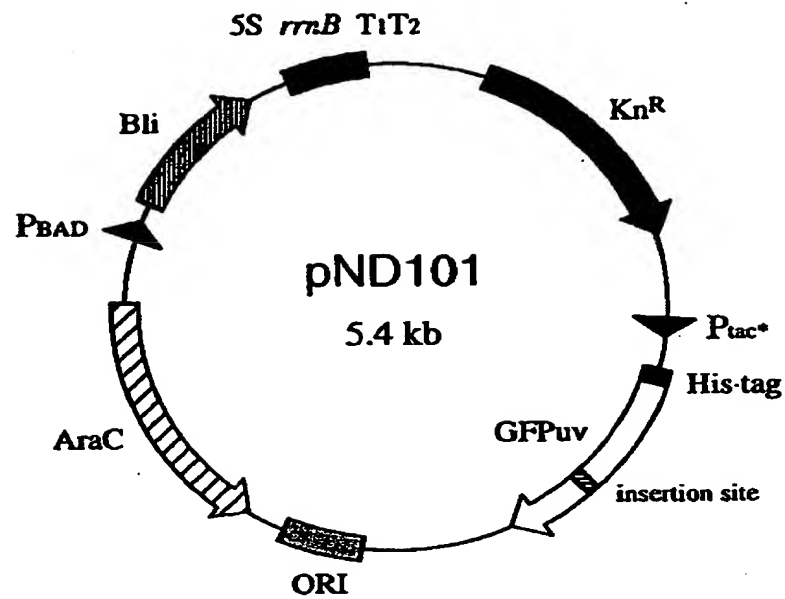
(a) センサータンパク質（濃度 $0.3 \mu\text{M}$ ）の蛍光スペクトル。(b) $7 \mu\text{M}$ の BLIP を添加した場合の蛍光スペクトル。(c) $7 \mu\text{M}$ の BSA（牛血清アルブミン）を添加した場合の蛍光スペクトル。

【書類名】 図面

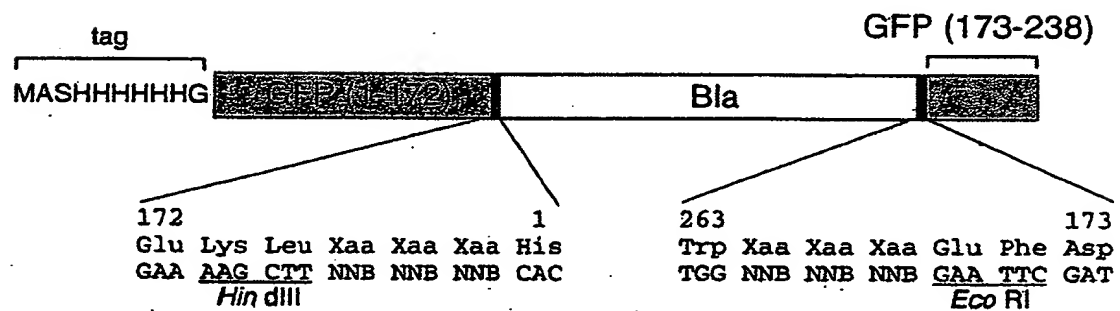
【図 1】



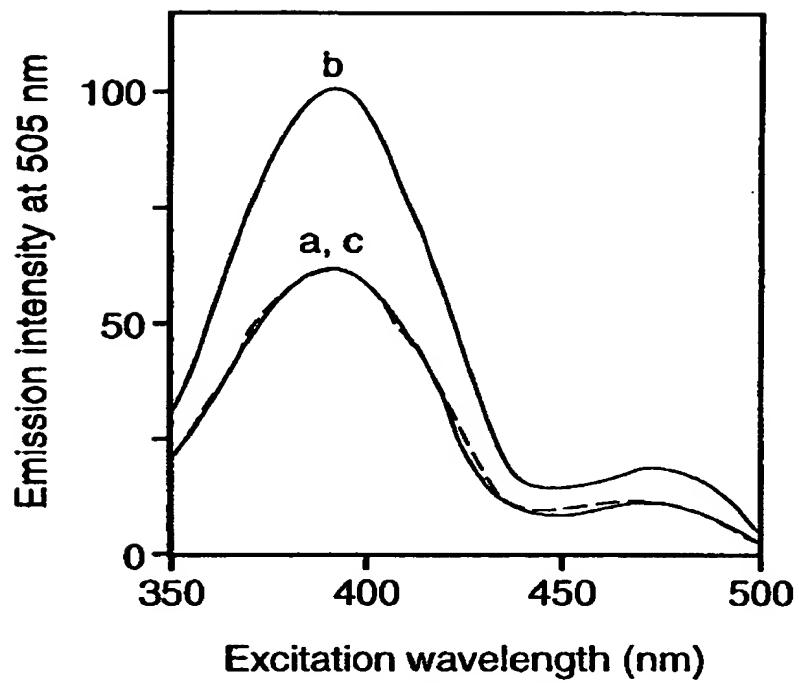
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生物学的な分子認識機構と物理学的な信号変換技術とを結びつけた、アロステリックな調節機能をもつバイオセンサーとして有用なサンドイッチ型融合高分子の提供。

【解決手段】 信号変換部位を含む第1の高分子部と第1の高分子部の間に挿入された分子認識部位を含む第2の高分子部とからなるサンドイッチ型融合高分子、該サンドイッチ型融合高分子をコードするDNA、該サンドイッチ型融合高分子を製造する方法、該サンドイッチ型融合高分子のセンサーとしての使用および所望のセンサーとしての該サンドイッチ型融合高分子のスクリーニング法の提供。

【効果】 本発明のサンドイッチ型融合高分子は、これまで利用することができなかったさまざまな高分子の特異的分子認識機構を組み込んだ分子センサーであり、自由にデザインして活性な分子センサーのスクリーニングが可能となる。本発明のセンサーは、細胞生物学、生物医学、環境、バイオコンピュータなど多くの分野で利用可能である。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100110607

【住所又は居所】 神奈川県大和市中央林間3丁目4番4号 サクライ
ビル 4階 間山国際特許事務所

【氏名又は名称】 間山 進也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日 1994年10月20日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名 三菱化学株式会社